

## 明細書

## 表皮の再生を促進するための創傷被覆材

## 技術分野

5 本発明は、表皮の再生を促進するための創傷被覆材に関する。さらに詳しくは、皮膚の表皮の再生を促進し、皮膚創傷の治癒に効果的な創傷被覆材に関する。

## 背景技術

アルギン酸塩 {製品名：カルトstatt (プリストル・マイヤーズ・スクイブ社製) } 、キチン {製品名：ベスキチン (ユニチカ製) } 、ハイドロコロイド {10 製品名：デュオアクティブ (プリストル・マイヤーズ・スクイブ社製) } 、又はポリウレタン {製品名：テガダーム (スリーエムヘルスケア社製) 、製品名：バイオクルーシブ (ジョンソン&ジョンソンメディカル社製) } 等を含む創傷被覆材が知られている (2000年メディカルプラスチックスの現状と将来展望、株式会社富士キメラ総研 (Fuji Chimera Research Institute, Inc.) 、2000年発行)。一方、コラーゲンからなる人工真皮 {製品名：テルダーミス (テルモ製) 、製品名：ペルナック (グンゼ製) } 等が知られている (2000年メディカルプラスチックスの現状と将来展望、株式会社富士キメラ総研 (Fuji Chimera Research Institute, Inc.) 、2000年発行)。

20

## 発明の要約

従来の創傷被覆材は、皮膚創傷面の湿潤環境を形成したり、外部からの感染菌の浸入を防止することにより、創傷を自然治癒させるが、皮膚創傷において皮膚の再生を促進する作用はない。表皮の自然治癒が困難な場合、従来の創傷被覆材は、皮膚にケロイド、肥厚性瘢痕又は瘢痕拘縮などの瘢痕が発生するという問題を有する。この瘢痕を防ぐためには、患者自身のそけい部 (太もものつけね) や鎖骨部等から全層または分層 (表皮) を創傷に移植をしている。したがって従来の創傷被覆材だけでは、たびたび、創傷を十分に治療できなかった。

一方、従来の人工真皮は、真皮を喪失した皮膚に適用することにより真皮の再

生を促進することができるが、表皮の再生を促進することはできない。よって、従来の人工真皮は、皮膚にケロイド、肥厚性瘢痕又は瘢痕拘縮などの瘢痕が発生するという問題を有する。この瘢痕を防ぐためには、真皮が再生した後に、患者自身のそけい部（太もものつけね）や鎖骨部等から皮膚の分層（表皮）を創傷に5 移植をする必要がある。したがって従来の人工真皮だけでは、たびたび、創傷を十分に治療できなかつた。

本発明の目的は、表皮の再生を促進することのできる創傷被覆材を提供することである。

本発明の表皮の再生を促進するための創傷被覆材の特徴は、Arg Gly Asp 配列10 (1) 、 Ile Lys Val Ala Val 配列 (2) 及び Tyr Ile Gly Ser Arg 配列 (3) からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの表皮再生促進最小アミノ酸配列 (X) と補助アミノ酸配列 (Y) とを有するポリペプチド (P) 、重量平均分子量が 2, 000~60, 000 のポリアルキレンポリアミン及び／又はポリアリーレンポリアミン (A) 、並びにシート (S) からなる点を要旨とする。

15 本発明は、また、上記創傷被覆材を用いて皮膚の表皮を再生治療する方法である。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 1 の創傷被覆材について、7 日目の DM マウスの創傷治癒状態20 を撮影した写真である。

図 2 は、比較例 7 の創傷被覆材について、7 日目の DM マウスの創傷治癒状態を撮影した写真である。

図 3 は、比較例 8 の創傷被覆材について、7 日目の DM マウスの創傷治癒状態を撮影した写真である。

25 図 4 は、実施例 1 の創傷被覆材について、14 日目の DM マウスの創傷治癒状態を撮影した写真である。

図 5 は、比較例 7 の創傷被覆材について、14 日目の DM マウスの創傷治癒状態を撮影した写真である。

図 6 は、比較例 8 の創傷被覆材について、14 日目の DM マウスの創傷治癒状

態を撮影した写真である。

### 発明の詳細な開示

表皮再生促進最小アミノ酸配列（X）は、Arg Gly Asp 配列（1）、Ile Lys 5 Val Ala Val 配列（2）及びTyr Ile Gly Ser Arg 配列（3）からなる群より選ばれる少なくとも1種であり、表皮再生促進の観点等から好ましくは Arg Gly Asp 配列（1）及び／又は Ile Lys Val Ala Val 配列（2）、特に好ましくは Arg Gly Asp 配列（1）である。なお、Arg Gly Asp 配列（1）とは、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列のことである。

10 ポリペプチド（P）は、表皮再生促進の観点等から、1分子中に好ましくは3～50個、さらに好ましくは4～35個、特に好ましくは5～20個の、表皮再生促進最小アミノ酸配列（X）を有する。なお、ポリペプチド（P）は2種以上の最小アミノ酸配列（X）を含んでいてもよい。

補助アミノ酸配列（Y）としては、最小アミノ酸配列（X）以外のアミノ酸配列が使用でき、ポリペプチド（P）の耐熱性の観点等から、Gly 及び／または Ala を有する配列が好ましい。（Y）としては、（Gly Ala）<sub>a</sub> 配列、（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）<sub>b</sub> 配列、（Gly Ala Gly Ala Gly Tyr）<sub>c</sub> 配列、（Gly Ala Gly Val Gly Tyr）<sub>d</sub> 配列、（Gly Ala Gly Tyr Gly Val）<sub>e</sub> 配列、{Asp Gly Gly (Ala)<sub>f</sub> Gly Gly Ala}<sub>g</sub> 配列、（Gly Val Pro Gly Val）<sub>h</sub> 配列、（Gly）<sub>i</sub> 配列、（Ala）<sub>j</sub> 配列、（Gly Gly Ala）<sub>k</sub> 配列、（Gly Val Gly Val Pro）<sub>m</sub> 配列、（Gly Pro Pro）<sub>n</sub> 配列、（Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly）<sub>o</sub> 配列、（Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln）<sub>p</sub> 配列及び／又は（Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro）<sub>q</sub> 配列を有する配列等が含まれる。これらのうち、（Gly Ala）<sub>a</sub> 配列、25 （Gly Ala Gly Ala Gly Ser）<sub>b</sub> 配列、（Gly Ala Gly Ala Gly Tyr）<sub>c</sub> 配列、（Gly Ala Gly Val Gly Tyr）<sub>d</sub> 配列、（Gly Ala Gly Tyr Gly Val）<sub>e</sub>、{Asp Gly Gly (Ala)<sub>f</sub> Gly Gly Ala}<sub>g</sub> 配列、（Gly Val Pro Gly Val）<sub>h</sub> 配列、（Gly Val Gly Val Pro）<sub>m</sub> 配列及び／又は（Gly Pro Pro）<sub>n</sub> 配列を有するものが好ましく、さらに好ましくは（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）<sub>b</sub> 配列、（Gly Va

1 Pro Gly Val) h 配列、 (Gly Val Gly Val Pro) m 配列及び／又は (Gly Pro Pro) n 配列を有するもの、特に好ましくは (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) b 配列を有するものである。

なお、a は 5～100 の整数、b、c、d 及び e は 2～33 の整数、f は 1～194 の整数、g は 1～{200／(6+f)} の小数点以下を切り捨てた整数、h は 2～40 の整数、i 及び j は 10～200 の整数、k は 3～66 の整数、m は 2～40 の整数、n は 3～66 の整数、o は 1～22 の整数、p 及び q は 1～13 の整数である。

(Gly Ala) a 配列を有するものとしては、配列番号 (4)～(6) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gly Ala Gly Ser) b 配列を有するものとしては、配列番号 (7)～(9) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gly Ala Gly Tyr) c 配列を有するものとしては、配列番号 (10)～(12) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gly Val Gly Tyr) d 配列を有するものとしては、配列番号 (13)～(15) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gly Tyr Gly Val) e 配列を有するものとしては、配列番号 (16)～(18) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

{Asp Gly Gly (Ala)f Gly Gly Ala} g 配列を有するものとしては、配列番号 (19)～(21) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Val Pro Gly Val) h 配列を有するものとしては、配列番号 (22)～(24) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly) i 配列を有するものとしては、配列番号 (25)～(27) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Ala) j 配列を有するものとしては、配列番号 (28)～(30) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Gly Ala) k 配列を有するものとしては、配列番号 (31)～(33) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Val Gly Val Pro) m 配列を有するものとしては、配列番号 (34)～

(36) で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Pro Pro) n配列を有するものとしては、配列番号(37)～(39)で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Gln Gly Pro Ala Gly Pro Gly) o配列を有するものとしては、  
5 配列番号(40)～(42)で表されるアミノ酸配列等が挙げられる。

(Gly Ala Pro Gly Ala Pro Gly Ser Gln Gly Ala Pro Gly Leu Gln) p配  
列を有するものとしては、配列番号(43)～(45)で表されるアミノ酸配列  
等が挙げられる。

(Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Pro Gln Gly Leu Pro Gly Ser Pro) q配  
10 列を有するものとしては、配列番号(46)～(48)で表されるアミノ酸配列  
等が挙げられる。

補助アミノ酸配列(Y)は、グリシン(Gly)及び／又はアラニン(Ala)を含むこ  
とが好ましい。グリシン(Gly)及び／又はアラニン(Ala)を含む場合、これら  
の合計含有割合(%)は、補助アミノ酸配列(Y)の全アミノ酸個数に基づいて、  
15 10～100が好ましく、さらに好ましくは20～95、特に好ましくは30～  
90、最も好ましくは40～85である。すなわち、(Gly)及び(Ala)の合計  
含有割合(%)の下限は、(Y)の全アミノ酸個数に基づいて、10が好ましく、  
さらに好ましくは20、特に好ましくは30、最も好ましくは40であり、また  
同様に上限は100が好ましく、さらに好ましくは95、特に好ましくは90、  
20 最も好ましくは85である。この範囲であると、ポリペプチド(P)の耐熱性が  
さらに良好となる。

グリシン(Gly)及びアラニン(Ala)の両方を含む場合、これらの含有個数割  
合(Gly/Ala)は、0.03～40が好ましく、さらに好ましくは0.08～1  
3、特に好ましくは0.2～5である。すなわち、この場合、グリシン(Gly)  
25 及びアラニン(Ala)の含有個数割合(Gly/Ala)の下限は、0.03が好まし  
く、さらに好ましくは0.08、特に好ましくは0.2であり、また同様に上限  
は40が好ましく、さらに好ましくは13、特に好ましくは5である。この範囲  
であると、ポリペプチド(P)の耐熱性がさらに良好となる。

ポリペプチド(P)は、ポリペプチド(P)の耐熱性の観点等から、1分子中

に好ましくは2～51個、さらに好ましくは3～35個、特に好ましくは4～20個の補助アミノ酸配列(Y)を有する。また、ポリペプチド(P)は、2種以上の補助アミノ酸配列(Y)を含んでもよい。

ポリペプチド(P)は、分岐鎖を含んでいてもよく、一部が架橋されていてもよく、環状構造を含んでいてもよい。しかし、ポリペプチド(P)は、架橋されていないことが好ましく、さらに好ましくは架橋されていない直鎖構造、特に好ましくは環状構造を持たず架橋されていない直鎖構造である。なお、直鎖構造には、 $\beta$ 構造(直鎖状ペプチドが折れ曲がってこの部分同士が平行に並び、その間に水素結合が作られる二次構造)も含まれる。

ポリペプチド(P)は、表皮再生促進及びポリペプチド(P)の耐熱性の観点等から、最小アミノ酸配列(X)と補助アミノ酸配列(Y)とが交互に化学結合してなる構造であることが好ましい。この場合、最小アミノ酸配列(X)と補助アミノ酸配列(Y)との繰り返し単位(X-Y)の数(個)は、表皮再生促進の観点等から、1分子中に2～50個が好ましく、さらに好ましくは2～40個、特に好ましくは3～30個、最も好ましくは4～20個である。

ポリペプチド(P)の重量平均分子量(M<sub>w</sub>)は、1,000～1,000,000が好ましく、さらに好ましくは2,000～700,000、特に好ましくは3,000～400,000、最も好ましくは4,000～200,000である。すなわち、ポリペプチド(P)の(M<sub>w</sub>)の下限は、1,000が好ましく、さらに好ましくは2,000、特に好ましくは3,000、最も好ましくは4,000であり、また同様に上限は1,000,000が好ましく、さらに好ましくは700,000、特に好ましくは400,000、最も好ましくは200,000である。

なお、本発明において、ポリペプチド(P)の重量平均分子量(M<sub>w</sub>)は、SDS-PAGE(SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動)法により、測定サンプル(ポリペプチド等)を分離し、泳動距離を標準物質と比較する方法によって求められる。

ポリペプチド(P)としては、以下のポリペプチドが好ましい。

(I) 最小アミノ酸配列(X)としてArg Gly Asp配列(1)を含むもの：

配列（1）13個と、補助アミノ酸配列（Y）として（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）配列（8）（y1）13個とを有し、これらが交互に化学結合してなる構造を有するMw約11万のポリペプチド（「プロネクチンF」、プロネクチンは登録商標（日本及び米国）である、三洋化成工業社製<以下同じ>）；

5 配列（1）5個と、補助アミノ酸配列（Y）として（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）配列（7）（y2）5個とを有し、これらが交互に化学結合してなる構造を有するMw約2万のポリペプチド（「プロネクチンF2」）；

配列（1）3個と、補助アミノ酸配列（Y）として（Gly Val Pro Gly Val）<sub>2</sub> Gly Gly（Gly Ala Gly Ala Gly Ser）配列（49）（y3）3個とを有し、

10 これらが交互に化学結合してなる構造を有するMw約10,000のポリペプチド（「プロネクチンF3」）等。

（II）最小アミノ酸配列（X）として Ile Lys Val Ala Val 配列（2）を含むもの：

プロネクチンF、プロネクチンF2又はプロネクチンF3の Arg Gly Asp 配列（1）を Ile Lys Val Ala Val 配列（2）に変更した「プロネクチンL」、「プロネクチンL2」、「プロネクチンL3」等。

（III）最小アミノ酸配列（X）として Tyr Ile Gly Ser Arg 配列（3）を含むもの：

プロネクチンF、プロネクチンF2又はプロネクチンF3の Arg Gly Asp 配列（1）を Tyr Ile Gly Ser Arg 配列（3）に変更した「プロネクチンY」、「プロネクチンY2」、又は「プロネクチンY3」等。

ポリペプチド（P）は、1種又は2種以上を用いることができる。

ポリペプチド（P）は、有機合成法（酵素法、固相合成法、液相合成法等）、遺伝子組み換え法等の人工的な方法によって容易に製造できる。有機合成法に関しては、生化学実験講座1、タンパク質の化学IV（1981年7月1日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行）又は続生化学実験講座2、タンパク質の化学（下）（昭和62年（1986年）5月20日、日本生化学会編、株式会社東京化学同人発行）に記載されている方法等が適用できる。遺伝子組み換え法に関しては、日本国特許第3338441号公報（U.S.P. 5514581）に対応

する：本明細書に取り込む）に記載されている方法等が適用できる。ポリペプチド（P）を安価に大量生産できるという観点等から、遺伝子組み換え法が好ましい。

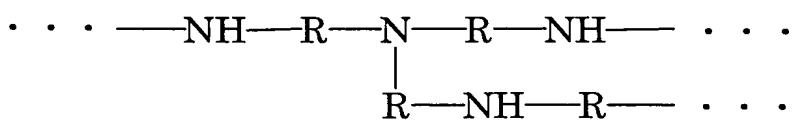
本発明の創傷被覆材は、ポリペプチド（P）とともに重量平均分子量が2,000～60,000のポリアルキレンポリアミン及び／又はポリアリーレンポリアミン（A）（以下、ポリアミン（A）と略する）からなるものである。本発明において、ポリアミン（A）は、表皮再生促進効果を発現させるための必須構成成分である。ポリアミン（A）以外の化合物、例えば、ポリーエチレンジミチルアミノエチルメタクリレート重合体（DEA重合体）、4級化DEA重合体等では、表皮再生促進効果は得られないか、あっても僅かである。

上記ポリアルキレンポリアミンとしては、アルキレン基複数個と、1～3級のアミノ基及びアンモニオ基からなる群より選ばれる少なくとも1種の複数個とをもつ化合物等が含まれる。

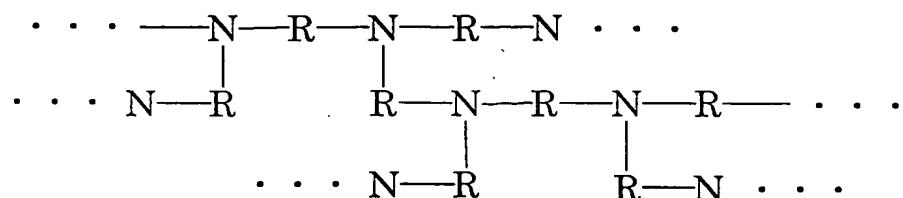
上記ポリアリーレンポリアミンとしては、アリーレン基複数個と、1～3級のアミノ基及びアンモニオ基からなる群より選ばれる少なくとも1種の複数個とをもつ化合物等が含まれる。

ポリアルキレンポリアミンは、アルキレンの一部がアリーレンに置き換わっていてもよい。また、ポリアリーレンポリアミンは、アリーレンの一部がアルキレンに置き換わっていてもよい。

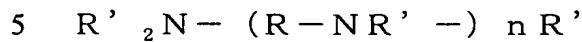
ポリアミン（A）は、直鎖状又は分岐状のいずれでもよい。なお、分岐状のポリアミンとしては、次のような化学構造（Rは、同じでも異なっていてもよいアルキレン基又はアリーレン基を示す。）が含まれる。



25



直鎖状ポリアミンとしては、次のような化学式（Rは同じでも異なってもよいアルキレン基又はアリーレン基を示し、R'は水素原子又は炭素数1～4のアルキルを示し、nはポリマーの重量平均分子量が2,000～60,000となる数を示す。）で表されるポリマーが含まれる。



ポリアミン（A）のアルキレン基としては、炭素数2～6のアルキレン（エチレン、プロピレン、iso-プロピレン、ブチレン、ヘキシレン等）基等が含まれる。

アリーレン基としては、炭素数4～8のアリーレン（フランジイル、フェニレン、トルエンジイル、キシレンジイル等）基等が含まれる。

1～3級のアミノ基及びアンモニオ基のうち、表皮再生促進の観点等から1～3級のアミノ基が好ましく、さらに好ましくは2級のアミノ基又は3級のアミノ基、特に好ましくは2級アミノ基である。すなわち、2級アミノ基を多く含むポリアミンが好ましい。

15 ポリアルキレンポリアミンとしては、ポリエチレンイミン、ポリ（エチレンイミン・N-メチルエチレンアミン）、ポリ（N-メチルエチレンアミン）、ポリ（エチレンイミン・N-エチルエチレンアミン）、ポリプロピレンイミン、ポリブチレンイミン、ポリ（エチレンイミン・プロピレンイミン）、ポリ（エチレンイミン・ヘキシレンイミン）等が含まれる。

20 ポリアリーレンポリアミンとしては、ポリフェニレンイミン、ポリ（フェニレンイミン・エチレンイミン）、ポリフランジイルイミン、ポリ（フランジイルイミン・エチレンイミン）等が含まれる。

ポリアミン（A）は、1種又は2種以上を用いることができる。

ポリアミン（A）としては、表皮再生促進の観点等からポリアルキレンポリアミンが好ましく、ポリエチレンイミンがより好ましい。

ポリアミン（A）は、次の公知の方法等で製造できる。

(1) アルキレンイミン（エチレンイミン、プロピレンイミン等）を触媒（二酸化炭素、塩酸、臭化水素酸、p-トルエンスルホン酸、メタンスルホン酸、塩化アルミニウム、三フッ化ホウ素等）の存在下に開環重合する方法。

(2) ハロゲン化アルキレン及び／又はハロゲン化アリーレン（例えば、塩化エチレン、臭化プロピレン等）と、アルキレンジアミン及び／又はアリーレンジアミン（例えば、エチレンジアミン、プロピレンジアミン等）とを重縮合反応する方法。

5 (3) アキサゾリドン-2等を加熱する方法。

(4) 生体から抽出する方法。

ポリアミン（A）のうち、アンモニオ基を有するポリアミン（A）は、上記の（1）～（4）の方法で得たポリアミン（A）を、更に酸及び／又は4級化剤で処理することにより得られる。

10 酸としては、鉱酸（塩酸、硫酸、硝酸、リン酸、過塩素酸等）、炭素数1～4の有機酸（ギ酸、酢酸、ブタン酸、メタンスルホン酸等）等が含まれる。

4級化剤としては、炭素数1～4のハロゲン化アルキル（メチルクロライド、臭化メチル、ヨウ化メチル、臭化ブチル等）、炭素数2～6のアルキル硫酸（ジメチル硫酸、ジエチル硫酸等）、炭素数2～6のアルキルカーボネート（ジメチルカーボネート、ジエチルカーボネート等）等が含まれる。

15 2級アミノ基及び／又は3級アミノ基を有するポリアミンは、1級アミノ基又は2級アミノ基を有するポリアミンを、4級化剤で処理することによっても得られる。

20 ポリアミン（A）のM<sub>w</sub>は、2,000～60,000であり、好ましくは3,000～50,000、より好ましくは4,000～40,000、特に好ましくは6,000～2万である。この範囲であると、表皮再生促進効果がさらに良好となる。

25 本発明において、ポリアミン（A）の重量平均分子量（M<sub>w</sub>）は、ポリエチレングリコールを標準物質としてゲルパーミエーションクロマトグラフィー（G P C）により測定された値である。

シート（S）の形態としては、フィルム、フォーム（スポンジ）、不織布、織布、編み布、ゲル状等が挙げられる。これらのうち、フィルム、フォームが好ましく、さらに好ましくはフィルムである。

シート（S）の厚さとしては、1μm～5cmが好ましく、さらに好ましくは

5  $\mu\text{m}$ ～1 cm、特に好ましくは15  $\mu\text{m}$ ～3 mm、最も好ましくは30～500  $\mu\text{m}$ である。

なお、フィルム及びフォームには微細な孔を全面又は一部に有していてもよい。この孔の大きさは、空気及び水蒸気が容易に通過できる程度の大きさが好ましい。

5 この穴の大きさ {孔の開孔面積 (mm<sup>2</sup>)} としては、0.001～500 mm<sup>2</sup> が好ましく、さらに好ましくは0.01～50 mm<sup>2</sup>、特に好ましくは0.1～5 mm<sup>2</sup>である。またこの孔の形状は円形、楕円形、三角形、四角形、その他の多角形、線状 (スリット) 等が挙げられる。

シート (S) の材質としては、細胞や生体に悪影響を及ぼさないものであれば制限がない。シート (S) としては、創傷等への適用時に、体液等に分散、溶解又は吸収され易い材料 {以下、易生分解性材料 (S 1)} 、創傷等への適用時に、体液等に分散、溶解又は吸収され難い材料 {以下、難生分解性材料 (S 2)} が使用できる。またシート (S) は、易生分解性材料 (S 1) 及び難生分解性材料 (S 2) を組み合わせてもよい。これらのシート (S) のうち、創傷面から創傷被覆材の剥がしやすさの観点等から、難生分解性材料 (S 2) が好ましい。

易生分解性材料 (S 1) としては、天然高分子 (S 1 A) 、合成高分子 (S 1 B) 、無機物 (S 1 C) 等が使用できる。

天然高分子 (S 1 A) としては、コラーゲン、ゼラチン、グリコサミノグリカン、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、エラスチン、キチン、キトサン、フィブリン、アルギン酸、デンプン、デキストラン、アルブミン、ポリヒドロキシ酪酸、ペクチン、ペクチン酸、ガラクトン、プルラン、アガロース、セルロース、グルテン、フィブロイン等が挙げられる。

合成高分子 (S 1 B) としては、乳酸、ロイシン、グリコール酸、 $\epsilon$ -カブロラクトン、ジオキサン、リンゴ酸、ラクチド及びグリコリドからなる群より選ばれた単量体を必須単量体としてなる (共) 重合体 (ポリグリコール酸) 、ポリペプチド (P) 以外の合成ポリペプチド等が挙げられる。

無機物 (S 1 C) としては、炭酸カルシウム (軽質炭酸カルシウム、重質炭酸カルシウム等) 、リン酸カルシウム {ヒドロキシアパタイト、トリカルシウムフ

オスフェート及びこれらと他のリン酸カルシウム（モノカルシウムハイドロジエントフォスフェート等）との混合物等} 等が含まれる。

これらのうち、天然高分子（S 1 A）、合成高分子（S 1 B）が好ましく、さらに好ましくは天然高分子（S 1 A）、特に好ましくはコラーゲン、ゼラチン、  
5 ヒアルロン酸、キチン、キトサン、フィブリン、アルギン酸、デンプン、デキストラン、アガロース、セルロース、フィブロインである。

難生分解性材料（S 2）としては、天然高分子（S 2 A）、合成高分子（S 2 B）、無機物（S 2 C）等が使用できる。

天然高分子（S 2 A）としては、天然繊維（綿、毛、麻、絹等）等が挙げられる。  
10

合成高分子（S 2 B）としては、ポリオレフィン（ポリエチレン、ポリプロピレン、これらの変性物等）、オレフィン共重合体（エチレン-ビニルアセテート共重合体、エチレン-エチル（メタ）アクリレート共重合体、エチレン-メチル（メタ）アクリレート共重合体、エチレン-（メタ）アクリル酸共重合体等）、  
15 ポリウレタン、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリアミド（ナイロン）、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレン、フッ素樹脂、シリコーン樹脂、セルロース、ビスコースレーヨン、キュプラレーヨン、ポリアセテート、ポリアクリルニトリル、ビニロン、ビニリデン等が用いられる。

無機物（S 2 C）としては、金属（金、銀、プラチナ、チタン、ニッケル等）、  
20 セラミックス（アルミナ、ジルコニア、窒化アルミニウム等）等が用いられる。

これらのうち、合成高分子（S 2 B）と無機物（S 2 C）が好ましく、さらに好ましくは合成高分子（S 2 B）、特に好ましくは、ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリエステル、ポリアクリル酸、ポリアミド（ナイロン）、ポリスチレン、シリコーン樹脂であり、最も好ましくはポリウレタンである。

25 ポリペプチド（P）とシート（S）とは、化学結合（イオン結合、水素結合及び／又は共有結合等）及び／又は物理吸着（ファンデルワールス力による吸着等）によって結合することができる。

ポリペプチド（P）とシート（S）とを共有結合させる方法としては、

（1）ポリペプチド（P）のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するもの {

アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、バリン、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、プロリン、システイン、リシン、セリン、グリシン、オルニチン、ヒスチジン、3-アミノプロピオン酸、8

5 一アミノオクタン酸及び／又は20-アミノエイコサン酸を構成単位として含む  
ポリペプチド（P）等} と、シート（S）のうちカルボキシル基を有するもの（  
ポリグリコール酸、表皮再生促進最小アミノ酸配列（X）を含まない合成ポリペ  
プチド、ポリエチレン又はポリプロピレンの変性物、エチレン-（メタ）アクリ  
ル酸共重合体、ポリアクリル酸、コラーゲン、ゼラチン、グリコサミノグリカン、  
10 ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、エラスチン、  
フィブリン、アルギン酸、アルブミン、ペクチン、ペクチン酸、グルテン及び／  
又はフィブロインからなるシート等）とを反応させる方法；

（2）ポリペプチド（P）のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものと、  
シート（S）のうちヒドロキシル基を有するもの（ポリグリコール酸、エチレン  
15 一ビニルアセテート共重合体、ポリウレタン、ポリエステル、セルロース、ビス  
コースレーション、キュプラレーション、ポリアセテート、ポリアクリルニトリル、  
ビニロン、ビニリデン、コラーゲン、ゼラチン、グリコサミノグリカン、ヒアル  
ロン酸、コンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸、デルマタン硫酸、ヘパリン、エラ  
スチン、キチン、キトサン、フィブリン、アルギン酸、デンプン、デキストラン、  
20 アルブミン、ポリヒドロキシ酪酸、ペクチン、ペクチン酸、ガラクトン、プルラ  
ン、アガロース、グルテン及び／又はフィブロインからなるシート等）とを反応  
させる方法；

（3）ポリペプチド（P）のうちヒドロキシル基を有するもの（アスパラギン酸、  
グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシン、チロニン及び／又はヒドロキシ  
25 プリンを構成単位として含むポリペプチド（P）等）と、シート（S）のうちカル  
ボキシル基を有するものとを反応させる方法等が挙げられる。

これらの反応は公知の方法（「ペプチド合成の基礎と実験、平成9年10月5  
日、丸善株式会社発行」に記載の方法等）で行うことができる。具体的には、以  
下の（1）～（3）の通りである。

(1) ポリペプチド (P) のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものとシート (S) のうちカルボキシル基を有するものとを反応させる場合、シート (S) のカルボキシル基を予めカルボジイミド化合物と反応させ、アシルイソ尿素 {R' - N=C (OCOR) - NH - R' (-OCORがシート (S) に由来する部分) }を得た後、ポリペプチド (P) のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものをこのアシルイソ尿素に加えることによって、シート (S) とポリペプチド (P) とをアミド結合できる。

カルボジイミド化合物としては、N, N' -ジシクロヘキシカルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩等が挙げられる。

(2) ポリペプチド (P) のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものとシート (S) のうちヒドロキシル基を有するものとを反応させる場合、シート (S) のヒドロキシル基を予めカルボニルジイミダゾール化合物と反応させ、イミダゾール誘導体 {R - Im, Imはイミダゾリン環、Rがシート (S) に由来}を得た後、ポリペプチド (P) のうち1級アミノ基又は2級アミノ基を有するものをこのイミダゾール誘導体に加えることによって、シート (S) とポリペプチド (P) とをN-C結合できる。

カルボニルジイミダゾール化合物としては、N, N' -カルボニルジイミダゾール等が挙げられる。

(3) ポリペプチド (P) のうちヒドロキシル基を有するものとシート (S) のうちカルボキシル基を有するものとを反応させる場合、シート (S) のカルボキシル基を予めカルボジイミド化合物と反応させ、アシルイソ尿素を得た後、ポリペプチド (P) のうちヒドロキシル基を有するものをこのアシルイソ尿素に加えることによって、シート (S) とポリペプチド (P) とをエステル結合できる。

ポリペプチド (P) をシート (S) に、物理吸着、イオン結合及び/又は水素結合させる方法としては、溶媒等にポリペプチド (P) と (S) とを投入し、混合して作製する方法等が挙げられる。溶媒としては特に制限はないが、無機塩、有機酸塩、酸及び/又は塩基を0.001~50重量% (好ましくは0.01~10重量%) 含有する水溶液等が使用できる。

無機塩としては、ハロゲン化金属塩、硫酸金属塩、リン酸金属塩、リン酸水素金属塩、硝酸金属塩、炭酸金属塩、過ハロゲン酸金属等が含まれ、具体的には、  
例えは、塩化ナトリウム、硫酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、塩化カルシウム、  
硝酸鉄、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、炭酸ナトリウム、リン酸水素ナトリ  
ウム、リン酸カリウム、リン酸水素カリウム、硫酸銅、硫酸鉄、塩化リチウム、  
臭化ナトリウム、臭化リチウム、過塩素酸ナトリウム、過塩素酸リチウム等が挙  
げられる。

有機酸塩としては、蟻酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、酢酸リチウム、酒石酸  
ナトリウム等が挙げられる。

10 酸としては、無機酸、炭素数1～6の有機酸等が含まれ、具体的には、例えは、  
塩酸、磷酸、酢酸、蟻酸、フェノール、硫酸が挙げられる。

塩基としては、無機塩基、炭素数2～6の有機塩基等が含まれ、具体的には、  
例えは、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア、トリエチルアミンが  
挙げられる。

15 水としては、蒸留水、イオン交換水、水道水、イオン交換蒸留水等が挙げられ  
る。

これらの溶媒の中で、無機塩、酸及び／又は塩基を含有する水溶液、水が好ま  
しく、さらに好ましくは無機塩、酸及び／又は塩基を含有する水溶液である。

20 ポリペプチド（P）とシート（S）とが強固に結合される点で、化学結合が好  
ましく、さらに好ましくは共有結合である。

創傷被覆材中のポリペプチド（P）の含有量は、表皮再生促進の観点等から、  
シート（S）の単位表面積あたり、 $0.1\text{ ng/cm}^2 \sim 100\text{ mg/cm}^2$ が好  
ましく、さらに好ましくは $1\text{ ng/cm}^2 \sim 10\text{ mg/cm}^2$ 、特に好ましくは $10\text{ ng/cm}^2 \sim 1\text{ mg/cm}^2$ 、最も好ましくは $100\text{ ng/cm}^2 \sim 100\mu\text{g/cm}^2$   
25 である。

なお、本発明において、単位表面積は、シート（S）の表面のうち、細胞が接  
着し得る表面の表面積を意味する。なお、細胞が入り込まないような微小な凹凸  
(例えは、 $1\mu\text{m}$ 以下) は平坦な表面として取扱うが、単位表面積を高める目的  
でリブ（畝）等が設けてある場合、このリブの表面積は単位表面積に含まれる。

単位表面積あたりのポリペプチド (P) の含有量の測定方法は特に限定されないが、例えば、免疫学的測定法が利用できる。本発明において、シート (S) の単位面積あたりのポリペプチド (P) の含有量は、創傷被覆材の表面の一部 (例えば、1 cm × 1 cm の正方形状) を切り取りとった試験片と、ポリペプチド (P) と結合する抗体に酵素を標識したものとを反応させ、反応した酵素標識抗体の酵素量を測定することにより得られる値によって示される。

酵素標識抗体は通常、酵素と特異抗体とを化学結合させたもの (公知の方法で化学結合できる) である。酵素 (ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等) と特異抗体とをグルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、ピリジルジスルフィド法等によって化学結合させる方法等 (超高感度酵素免疫測定法、石川榮治著、株式会社学会出版センター、1993年; エンザイムイムノアッセイ、石川榮治訳、株式会社東京化学同人、1989年; 及び酵素抗体法、渡辺慶一ら編、学際企画株式会社、1992年) が適用できる。

また、特異抗体はポリペプチド (P) に特異的に結合する抗体 (公知の方法; ポリクローナル抗体作製法及びモノクローナル抗体作製法 (エンザイムイムノアッセイ、石川榮治訳、株式会社東京化学同人、1989年; 及び酵素抗体法、渡辺慶一ら編、学際企画株式会社、1992年) 等が適用できる) である。尚、特異抗体の交差反応性抗原に対する親和定数は小さいほど好ましい。例えば、特異抗体のポリペプチド (P) への親和定数を1とした場合、交差反応性抗原に対する親和定数は、1以下が好ましく、さらに好ましくは0.1以下、特に好ましくは0.01以下である。この親和定数はエンザイムイムノアッセイ (石川榮治訳、株式会社東京化学同人、1989年) に記載の方法で得ることが出来る。

ポリアミン (A) は、シート (S) 及び/又はポリペプチド (P) に結合されていることが好ましい。

ポリアミン (A) をシート (S) 及び/又はポリペプチド (P) に結合する方法としては、化学反応させる方法、物理吸着させる方法 (前述のポリペプチド (P) とシート (S) との結合方法と同様の方法) 等が適用できる。

創傷被覆材中のポリアミン (A) の含有量 (個/cm<sup>2</sup>) は、表皮再生促進の

観点から、シート（S）の単位面積あたりのアミノ基の平均個数として、 $10^8$ ～ $10^{22}$ が好ましく、さらに好ましくは $10^{10}$ ～ $10^{20}$ である。

アミノ基の平均個数は、公知の方法、たとえば、トリニトロベンゼンスルホン酸（T N B S）法（タンパク質の化学IV（東京化学同人発行、1981年）等5）や塩酸・指示薬（プロムフェノールブルー等）滴定法による全アミン価測定法（J I S K 7 2 3 7 - 1 9 8 6 や、A S T M D 2 0 7 4 - 6 6 等）等によつて測定できる。

本発明において、具体的には、シート（S）の単位面積あたりのアミノ基の平均個数（個/ $\text{cm}^2$ ）は、以下のようにして測定される。アミノ基の個数が既知10のポリアミン（A）又は（A）の溶液についての検量線（アミノ基の個数と吸光度のグラフ）をT N B S法により作製する。

創傷被覆材の表面の一部（例えば、 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ の正方形状）を切り取りとった試験片の吸光度は、T N B S法により測定され、検量線を用いてアミノ基の個数に換算される。

15 本発明の創傷被覆材は、必要に応じて滅菌処理を施してもよい。滅菌方法としては、放射線、エチレンオキサイドガス、プラズマ、 $\gamma$ 線、アルコール、オートクレーブ、乾熱等を用いた滅菌方法が適用できる。これらは、1種の方法のみで行ってもよいし、2種以上を組み合わせてもよい。

本発明の創傷被覆材は、創傷面を被覆できれば制限なく適用できる。この創傷被覆材は、接着剤若しくは粘着剤付きのカバー、包帯、伸縮自在メッシュ、眼帯等を用いて固定されてもよく、縫合又は接着されてもよい。また、この創傷被覆材は、他の創傷治療剤（軟膏、クリーム、パウダー、抗菌剤、ヨウ素製剤、創傷被覆材、人工真皮細胞増殖因子等）の1種又は2種以上と併用してもよい。

20 創傷とは、熱傷、褥瘡、潰瘍、外傷、採皮創等を含む、皮膚が損傷した症状である。

本発明の創傷被覆材は、表皮再生を必要する創傷に使用できる他に、表皮の一部又は表皮の全層欠損にも適用できる。

本発明の皮膚の表皮を再生治療する方法は、上記創傷被覆材を用いることを特徴とするものである。

## 産業上の利用可能性

本発明の創傷被覆材は、表皮の再生を促進する効果が極めて高い。よって、本発明のフィルムは、表皮が欠損した創傷（褥瘡、潰瘍、熱傷、外傷、採皮創等）  
5 の治療等に好適である。したがって、本発明の創傷被覆材は、瘢痕の発生、表皮の移植等の問題がないため、患者の大きな負担なしに、創傷を容易に治療できる。

## 実施例

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれに限定さ  
10 れるものではない。なお、特記しない限り%は重量%を意味する。

### <実施例1>

#### (1) プロネクチンF水溶液の調製

Arg Gly Asp配列(1)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)配列(8)とを各々約13個有し、Mw約11万である「プロネクチンF（三洋化成工業株式会社製  
15 ）」の2.5mgと4.5M過塩素酸リチウム水溶液の2.5mLとの溶液を、99.5%の塩化ナトリウムを0.85%で含有する0.02M, pH7.2のリン酸緩衝液（以下、PBS）で20倍希釈して、P1水溶液（プロネクチンF濃度50 $\mu$ g/mL）を得た。

#### (2) ポリエチレンイミン10,000水溶液の調製

20 ポリエチレンイミン(Mw10,000、和光純薬工業株式会社製)の10mgを1mLのイオン交換水に溶解して、ポリエチレンイミン10,000水溶液（ポリエチレンイミン濃度10mg/mL）を得た。

#### (3) シート(B1)の調製

25 水性ウレタン（商品名：パーマリンUA200、三洋化成工業株式会社製）の6.67gとイオン交換水の3.33gとから調製されたウレタン水溶液を、縦20cm×横20cm×高さ1mmのポリプロピレンシート（株式会社メディカルエイジェント製）上に塗布し、塗布シートを得た。この塗布シートを室温（約25°C）に24時間放置した後に、この塗布シートを順風乾燥機中で120°C、1時間乾燥して乾燥シートを得た。次いで、ウレタンフィルム（シート(B1)

} を、乾燥シートから剥離することにより得た。

(4) 表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 1) の調製

1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(シグマ社製)の0.479gを50mLのイオン交換水に溶解し、カルボジイミド水溶液を得た。このカルボジイミド水溶液の50mLとシート(B 1)の10cm×10cmとをガラスシャーレに投入し、25°Cで1時間静置して、処理シートを得た。その後、この処理シートを100mLのイオン交換水で5回洗浄し、ガラスシャーレに入ったP 1水溶液の50mLに投入し、25°Cで30分静置した。この後、ポリエチレンイミン10,000水溶液の0.5mLをガラスシャーレに投入し、25°Cでさらに30分静置して、結合シートを得た。その後、結合シートを100mLのイオン交換水で5回洗浄し、37°Cの順風乾燥機の中で12時間乾燥させ、表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 1) を得た(プロネクチンFの付着量:約1μg/cm<sup>2</sup>)。

15 <実施例2>

(1) プロネクチンF 2水溶液の調製

Arg Gly Asp配列(1)と(Gly Ala Gly Ala Gly Ser)配列(7)とを各々約5個有し、Mw約2万のプロネクチンF 2(三洋化成工業株式会社製)の2.5mgと4.5M過塩素酸リチウム水溶液の2.5mLとからなる溶液を、99.5%の塩化ナトリウムを0.85%で含有する0.02M, pH 7.2のリン酸緩衝液(以下、P B S)で20倍希釈して、P 2水溶液(プロネクチンF 2濃度50μg/mL)を得た。

(2) 表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 2) の調製

P 1水溶液の代わりにP 2水溶液を使用する以外は、実施例1と同様にして、表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 2) を作製した(プロネクチンF 2の付着量:約1μg/cm<sup>2</sup>)。

<実施例3>

(1) プロネクチンF 3水溶液の調製

Arg Gly Asp 配列 (1) と (Gly Val Pro Gly Val) <sub>2</sub>Gly Gly (Gly Ala Gl  
y Ala Gly Ser) <sub>2</sub>配列 (4 9) とを各々約3個有し、Mw約10,000のプロネクチンF3 (三洋化成工業株式会社製) の2.5mgと4.5M過塩素酸リチウム水溶液の2.5mLとからなる溶液を、99.5%の塩化ナトリウムを0.85%で含有する0.02M、pH7.2のリン酸緩衝液 (以下、PBS) で20倍希釈して、P3水溶液 (プロネクチンF3濃度50μg/mL) を得た。

(2) 表皮再生促進用創傷被覆材 (PB3) の調製

P1水溶液の代わりにP3水溶液を使用する以外は、実施例1と同様にして、表皮再生促進用創傷被覆材 (PB3) を作製した (プロネクチンF3の付着量: 約1μg/cm<sup>2</sup>)。

<実施例4>

(1) プロネクチンL水溶液の調製

Ile Lys Val Ala Val 配列 (2) と (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) <sub>2</sub>配列 (8) とを各々約13個有し、Mw約11万のプロネクチンL (三洋化成工業株式会社製) の2.5mgと4.5M過塩素酸リチウム水溶液の2.5mLとからなる溶液を、99.5%の塩化ナトリウムを0.85%で含有する0.02M、pH7.2のリン酸緩衝液 (以下、PBS) で20倍希釈して、P4水溶液 (プロネクチンL濃度50μg/mL) を得た。

(2) 表皮再生促進用創傷被覆材 (PB4) の調製

P1水溶液の代わりにP4水溶液を使用する以外は、実施例1と同様にして、表皮再生促進用創傷被覆材 (PB4) を作製した (プロネクチンLの付着量: 約1μg/cm<sup>2</sup>)。

<実施例5>

(1) ポリエチレンイミン55,000水溶液の調製

ポリエチレンイミン50,000~100,000 (重量平均分子量50,000~100,000、ICN Biomedicals社製) の10mgを1mLのイオン交換水に溶解した溶液をスーパーDEックス (アマシャムファルマシ

ア製) でゲルろ過し、重量平均分子量 50, 000~60, 000 の分画を分取した。分取した溶液を限外ろ過によって濃縮し、ポリエチレンイミン 55, 000 水溶液 ( $M_w$  55, 000、ポリエチレンイミン濃度 10 mg/mL) を得た。

(2) 表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 5) の調製

5 ポリエチレンイミン 10, 000 水溶液の代わりにポリエチレンイミン 55, 000 水溶液を使用する以外は、実施例 1 と同様にして、表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 5) を作製した (プロネクチン F の付着量: 約 1  $\mu$  g/cm<sup>2</sup>)。

<実施例 6 >

10 (1) ポリエチレンイミン 5, 000 水溶液の調製

ポリエチレンイミン 50% 水溶液 (重量平均分子量 50~60, 000、ACROS ORGANIC INC 社製) の 20 mg を 1 mL のイオン交換水に溶解した溶液をスーパー・デックス (アマシャム・ファルマシア製) でゲルろ過し、重量平均分子量 3, 000~7, 000 の分画を分取した。分取した溶液を限外ろ過によって濃縮し、ポリエチレンイミン 5, 000 水溶液 ( $M_w$  5, 000、ポリエチレンイミン濃度 10 mg/mL) を得た。

(2) 表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 6) の調製

ポリエチレンイミン 10, 000 水溶液の代わりにポリエチレンイミン 5, 000 水溶液を使用する以外は、実施例 1 と同様にして、表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 6) を作製した (プロネクチン F の付着量: 約 1  $\mu$  g/cm<sup>2</sup>)。

<実施例 7 >

(1) 3 級化ポリエチレンイミン 10, 000 水溶液の調製

ポリエチレンイミン 10, 000 水溶液 (10 mg/mL) の 100 mL に、25 メチルクロリド 0.5 g 及び水酸化カリウム 1.5 g を加え、80°C で 8 時間反応させた。反応後の水溶液を透析膜で透析した水溶液を限外ろ過によって濃縮し、3 級化ポリエチレンイミン 10, 000 水溶液 ( $M_w$  10, 000、3 級化ポリエチレンイミン濃度 10 mg/mL) を得た。

(2) 表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 7) の調製

ポリエチレンイミン 10,000 水溶液の代わりに 3 級化ポリエチレンイミン 10,000 水溶液を使用する以外は、実施例 1 と同様にして、表皮再生促進用創傷被覆材 (P B 7) を作製した (プロネクチン F の付着量: 約  $1 \mu \text{g} / \text{cm}^2$  )。

5

<比較例 1 >

(1) ポリエチレンイミン 1,800 水溶液の調製

ポリエチレンイミン ( $M_w$  1,800、和光純薬工業株式会社製) の 10 mg を 1 mL のイオン交換水に溶解して、ポリエチレンイミン 1,800 水溶液 (ポリエチレンイミン濃度 10 mg/mL) を得た。

(2) 創傷被覆材 (H B 1) の調製

ポリエチレンイミン 10,000 水溶液の代わりに ポリエチレンイミン 1,800 水溶液を使用する以外は、実施例 1 と同様にして、創傷被覆材 (H B 1) を作製した (プロネクチン F の付着量: 約  $1 \mu \text{g} / \text{cm}^2$  )。

15

<比較例 2 >

(1) ポリエチレンイミン 75,000 水溶液の調製

ポリエチレンイミン 50,000~100,000 (重量平均分子量 50,000~100,000、ICN Biomedicals 社製) の 10 mg を 1 mL のイオン交換水に溶解した溶液をスーパーデックス (アマシャムファルマシア製) でゲルろ過し、重量平均分子量 70,000~80,000 の分画を分取した。分取した溶液を限外ろ過によって濃縮し、ポリエチレンイミン 75,000 水溶液 ( $M_w$  75,000、ポリエチレンイミン濃度 10 mg/mL) を得た。

(2) 創傷被覆材 (H B 2) の調製

ポリエチレンイミン 10,000 水溶液の代わりに ポリエチレンイミン 75,000 水溶液を使用する以外は、実施例 1 と同様にして、創傷被覆材 (H B 2) を作製した (プロネクチン F の付着量: 約  $1 \mu \text{g} / \text{cm}^2$  )。

<比較例 3 >

## (1) ポリーエリジン水溶液の調製

ポリーエリジン (Mw 50,000、和光純薬工業株式会社製) の 10 mg を 1 mL のイオン交換水に溶解して、ポリーエリジン水溶液 (ポリーエリジン濃度 10 mg/mL) を得た。

## 5 (2) 創傷被覆材 (HB3) の調製

ポリエチレンイミン 10,000 水溶液の代わりにポリーエリジン水溶液を使用する以外は、実施例 1 と同様にして、創傷被覆材 (HB3) を作製した (プロネクチン F の付着量: 約 1 μg/cm<sup>2</sup>)。

## 10 &lt;比較例 4&gt;

## (1) ジメチルアミノエチルメタクリレート重合体 15,000 水溶液の調製

10 mL 試験管にジメチルアミノエチルメタクリレート 2 g、アゾビスイソヴァレロニトリル 0.04 g およびジオキサン 2 g を加え、窒素置換後、密閉下、70°C 湯浴中で 4 時間振盪した。得られた溶液をヘキサン 100 mL 中に滴下し、ポリマーを析出させた。このポリマーを乾燥することによりジメチルアミノエチルメタクリレート重合体 (DAE 重合体) を得た。次いで、イオン交換水に溶解した DAE 重合体をスーパーデックス (アマシャムファルマシア製) でゲルろ過し、分子量 10,000 ~ 20,000 の分画を分取した。分取した溶液を限外ろ過によって濃縮し、DAE 重合体 15,000 水溶液 (Mw 15,000、DAE 重合体濃度 10 mg/mL) を得た。

## (2) 表皮再生促進用創傷被覆材 (PB6) の調製

ポリエチレンイミン 10,000 水溶液の代わりに DAE 重合体 15,000 水溶液を使用する以外は、実施例 1 と同様にして、表皮再生促進用創傷被覆材 (PB6) を作製した (プロネクチン F の付着量: 約 1 μg/cm<sup>2</sup>)。

## 25

## &lt;比較例 5&gt;

## (1) 4 級化 DAE 重合体 15,000 水溶液の調製

10 mL 試験管にジメチルアミノエチルメタクリレート 2 g、アゾビスイソヴァレロニトリル 0.04 g およびジオキサン 2 g を加え、窒素置換後、密閉下、

70°C湯浴中で4時間振盪した。得られた溶液をヘキサン100mL中に滴下し、ポリマーを析出させた。このポリマーを乾燥することによりジメチルアミノエチルメタクリレート重合体(DAE重合体)を得た。次いで、イオン交換水に溶解したDAE重合体(10mg/mL)の100mLに、メチルクロリド5gを加え、80°Cで8時間反応させて、4級化DAE重合体水溶液を作製した。この4級化DAE重合体水溶液をスーパーDEックス(アマシャムファルマシア製)でゲルろ過し、分子量10,000~20,000の分画を分取した。分取した溶液を限外ろ過によって濃縮し、4級化DAE重合体15,000水溶液( $M_w$ 15,000、4級化DAE重合体濃度10mg/mL)を得た。

10 (2) 表皮再生促進用創傷被覆材(PB7)の調製

ポリエチレンイミン10,000水溶液の代わりに4級化DAE重合体15,000水溶液を使用する以外は、実施例1と同様にして、表皮再生促進用創傷被覆材(PB7)を作製した(プロネクチンFの付着量:約1 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)。

15 <比較例6>

(1) 創傷被覆材(HB6)の調製

ポリエチレンイミン10,000水溶液を使用しないこと以外は、実施例1と同様にして、創傷被覆材(HB6)を作製した(プロネクチンFの付着量:約1 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>)。

20

<比較例7>

シート(B1)を比較用の創傷被覆材とした。

<比較例8>

25 商品名:バイオクルーシブ(ジョンソン&ジョンソン社製ポリウレタンフィルム)を比較用の創傷被覆材(B2)とした。

<評価1(培養皮膚)>

実施例1~7、比較例1~8の創傷被覆材から、直径2cmの大きさの円形を

切り取り、クリーンベンチ中でUV照射を2時間行って滅菌した。

一方で、三次元培養組織構築キット：P r e T i s s u e - S k i n 1（東洋紡績株式会社製）を用いて、本キットの取扱説明書にしたがって、培養真皮を作製した。この培養真皮の中央部に表皮細胞を播種して、培養皮膚を得た。

5 次に、表皮培地（Epidermal Medium）を培養皮膚の高さまで加えた。この培養皮膚の上面に上記で得た円形の創傷被覆材を被せた。そして、この培養皮膚は、37°C、CO<sub>2</sub>濃度5容量%のインキュベーター中にて4日間、培養された。

培養4日後に、表皮培地を除去し、A/L培養培地（Air/Liquid Culture Medium）を培養皮膚の高さまで加えた。そして、培養皮膚はさらに7日間、培養された。

次いで、創傷被覆材を培養皮膚の上面から剥がした後、培養皮膚をホルマリンで固定し、パラフィン包埋処理することにより、組織切片を得た。この組織切片をヘマトキシリソ・エオジン染色（H-E染色）により処理した後、培養皮膚の表皮再生状態を観察した。

15

#### ＜判定基準＞

○；真皮上面の全体に表皮細胞が重層化し、全体的に表皮が再生されている。

△；真皮上面の一部に表皮細胞が重層化し、部分的に表皮が再生されている。

×；真皮上面に表皮細胞が存在するが、重層化されておらず、表皮は全く再生

20 されていない。

表 1

		創傷被覆材	表皮再生状態
実施例	1	PB1	○
	2	PB2	○
	3	PB3	○
	4	PB4	○
	5	PB5	○
	6	PB6	○
	7	PB7	○
比較例	1	HB1	△
	2	HB2	△
	3	HB3	×
	4	HB4	×
	5	HB5	×
	6	HB6	×
	7	B1	×
	8	B2	×

15 表 1 の結果から、本発明の表皮再生促進用創傷被覆材 (PB1) ~ (PB7) を用いた実施例 1 ~ 7 では、全体的に表皮が再生されているのに対して、比較例の創傷被覆材 (HB1) ~ (HB6)、(B1) 及び (B2) を用いた比較例 1 ~ 8 は、いずれも表皮が部分的にしか再生されていないか、全く再生されていないことが明らかである。

20

## &lt;評価 2 (動物実験) &gt;

DMマウス (C57BLK Jcl db/db、日本クレア株式会社製) を、ジエチルエーテルにより吸気麻酔した後、フェザーブラシを用いて背部全面を剃毛し、その中央部に円形 (直径 1.4 cm) の全層皮膚欠損創を作製した。なお、

25 糖尿確認用ストリップ (ウロピース、藤沢薬品工業株式会社製) により、DMマウスは糖尿病が発症していることを確認した。

## (1) 実施例 1 の創傷被覆材 (PB1) の適用

2 cm × 2 cm の大きさに切り取った実施例 1 の創傷被覆材 (PB1) を、商品名: バイオクルーシブ (ジョンソン&ジョンソン社製) に貼り合わせた後、創

傷被覆材が該創面に当たるようにして、DMマウスの全層皮膚欠損創に貼り付けた。さらに創面との密着性を上げるため、脱脂綿を重ねた後、粘着性バンデージ（商品名：シルキーテックス、アルケア株式会社製）で体幹部全周を巻き付けた。生育温度は室温24°Cであり、DMマウスは飼料及び水を自由に摂取できる環境におかれた。なお開始後3日目に創傷被覆材を創面から取り外し、再度、バイオクルーシブと共に創傷被覆材（PB1）を適用した。

（2）比較例7の創傷被覆材（B1）及びトラフェルミン溶液の適用：

褥瘡・皮膚潰瘍治療剤であるフィブラストスプレー250（科研製薬株式会社製）の250μgを2.5mLの生理食塩水に溶解し、100μg/mLのトラフェルミン溶液を調製した。

創傷被覆材（PB1）に代えて比較例7の創傷被覆材（B1）を用いたこと、創傷被覆材（B1）を創傷被覆材と共に張り合わせる前に、トラフェルミン溶液の0.2mL（トラフェルミン20μgに相当）を全層皮膚欠損創にピペットで滴下したこと以外は、上記（1）と同様にして、DMマウスの育生を開始した。なお開始後3日目に創傷被覆材を創面から取り外した後、トラフェルミン溶液0.2mLを欠損創に滴下し、再度、バイオクルーシブと共に創傷被覆材（B1）を適用した。

（3）比較例8の創傷被覆材（B2）の適用

比較例8の創傷被覆材（B2）が該創面に当たるよう貼り付けた。創面との密着性を上げるため、脱脂綿を重ねた後、粘着性バンデージ（商品名：シルキーテックス、アルケア株式会社製）で体幹部全周を巻き付けた。上記の（1）と同様にして、DMマウスの育生を開始した。なお開始後3日目に創傷被覆材を創面から取り外し、再度、創傷被覆材（B2）を適用した。

（4）創傷治癒状態の観察

育生開始後7日目および14日目に、創傷被覆材を創面から取り外し、創面の肉眼観察を行った。その写真を図1（7日目、創傷被覆材（PB1））、図2（7日目、創傷被覆材（B1）+トラフェルミン溶液）、図3（7日目、創傷被覆材（B2））、図4（14日目、創傷被覆材（PB1））、図5（14日目、創傷被覆材（B1）+トラフェルミン溶液）、図6（14日目、創傷被覆材（B2））。

) ) に示す。

7 日目の結果として、実施例 1 の本発明の創傷被覆材 (P B 1) を用いたもの (図 1) は、創縁全周囲からの表皮形成が認められた。一方、比較例 7 の創傷被覆材 (B 1) + トラフェルミン溶液を用いたもの (図 2) 及び比較例 8 の創傷被覆材 (B 2) を用いたもの (図 3) は、表皮形成が認められなかった。

14 日目の結果として、実施例 1 の本発明の創傷被覆材 (P B 1) を用いたもの (図 4) は、創面全体に表皮形成が認められた。一方、比較例 7 の創傷被覆材 (B 1) + トラフェルミン溶液を用いたもの (図 5) は、創面の一部には表皮形成が認められたが、創面全体には表皮形成が認められなかった。また比較例 8 の創傷被覆材 (B 2) を用いたもの (図 6) は、表皮形成が認められなかった。

すなわち、本発明の創傷被覆材では、創傷を完治できるのに対して、比較例の創傷被覆材では、治療が全く不十分であった。

## 請求の範囲

1. Arg Gly Asp 配列 (1)、Ile Lys Val Ala Val 配列 (2) 及び Tyr Ile Gly Ser Arg 配列 (3) からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの表皮再生促進最小アミノ酸配列 (X) と補助アミノ酸配列 (Y) とを有するポリペプチド (P)、

重量平均分子量が 2,000~60,000 のポリアルキレンポリアミン及び／又はポリアリーレンポリアミン (A)、

並びにシート (S) からなる、表皮の再生を促進するための創傷被覆材。

10

2. 表皮再生促進最小アミノ酸配列 (X) をポリペプチド (P) の 1 分子中に 3~50 個有してなる請求項 1 に記載の創傷被覆材。

15 3. 補助アミノ酸配列 (Y) をポリペプチド (P) の 1 分子中に 2~51 個有してなる請求項 1 又は 2 に記載の創傷被覆材。

4. ポリペプチド (P) が、表皮再生促進最小アミノ酸配列 (X) と補助アミノ酸配列 (Y) とが交互に化学結合してなる構造である請求項 1 に記載の創傷被覆材。

20

5. 表皮再生促進最小アミノ酸配列 (X) が Arg Gly Asp 配列 (1) である請求項 1 に記載の創傷被覆材。

25 6. 補助アミノ酸配列 (Y) が (Gly Ala Gly Ala Gly Ser) <sub>b</sub> 配列 (b は 2~33 の整数である) である請求項 1 に記載の創傷被覆材。

7. ポリアルキレンポリアミン及び／又はポリアリーレンポリアミン (A) がポリエチレンイミンである請求項 1 に記載の創傷被覆材。

8. 請求項1に記載の創傷被覆材を用いて皮膚の表皮を再生治療する方法。

## 要約書

本発明は、表皮の再生を促進することのできる創傷被覆材を提供することである。

5 本発明は、Arg Gly Asp 配列（1）、Ile Lys Val Ala Val 配列（2）及び Tyr Ile Gly Ser Arg 配列（3）からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの表皮再生促進最小アミノ酸配列（X）と補助アミノ酸配列（Y）とを有するポリペプチド（P）、重量平均分子量が 2,000～60,000 のポリアルキレンポリアミン及び／又はポリアリーレンポリアミン（A）、並びにシート（S）からなる、表皮の再生を促進するための創傷被覆材である。